

GRAU EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

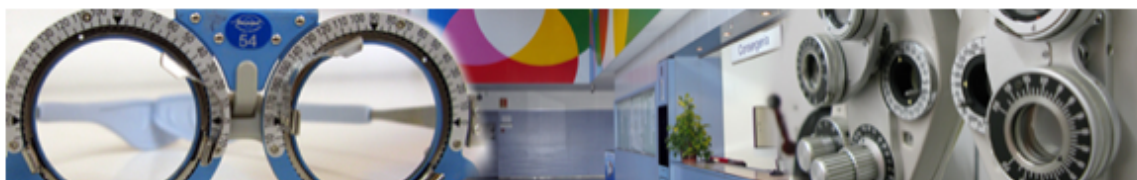
TREBALL FINAL DE GRAU

RESPUESTA DEL FOTOPIGMENTO RODOPSINA A DIFERENTES INTENSIDADES LUMÍNICAS

MARIO VÉLEZ VERA

MARGARITA MORILLO
PERE GARRIGA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

30/05/2016



GRAU EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

La Sra.**Margarita Morillo**....., com a tutora del treball y el Sr.
.....**Pere Garriga**..... com a director/a del treball

CERTIFIQUEN

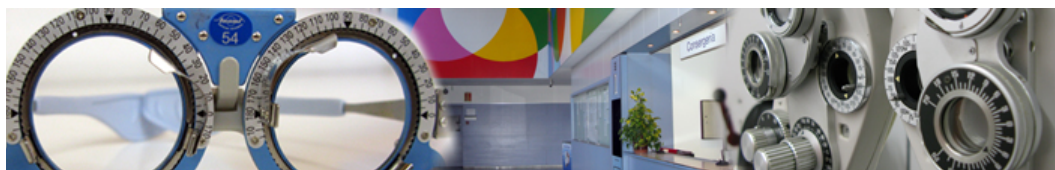
Que el Sr./Sra.**Mario Vélez Vera**..... ha realitzat sota la seva supervisió el treball ...**Respuesta del Fotopigmento Rodopsina a diferentes intensidades lumínicas**... que es recull en aquesta memòria per optar al títol de grau en Òptica i Optometria.

I per a què consti, signo/em aquest certificat.

Sr/Sra.....
Tutor/a del treball

Sr/Sra.....
Director/a del treball

Terrassa, ...30.... de**Mayo**..... de 2016



GRAU EN OPTICA I OPTOMETRIA

RESPUESTA DEL FOTOPIGMENTO RODOPSINA A DIFERENTES INTENSIDADES LUMÍNICAS

RESUMEN

La rodopsina es un fotopigmento, concretamente una glicoproteína integral de membrana que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Tiene la función de detectar los fotones y responder a un estímulo luminoso.

A partir del experimento realizado en el que se ha utilizado rodopsina bovina y ha sido iluminada directamente bajo diferentes intensidades en periodos de tiempo medidos se ha podido comprobar que en un periodo corto de tiempo (5s) se puede llegar prácticamente al blanqueamiento total del fotorreceptor.

En cambio cuando ésta es sometida a una intensidad de iluminación mínima la cantidad de absorbancia va disminuyendo progresivamente, este comportamiento confirma su función de fotorreceptor que trabaja en condiciones de baja iluminación.

Palabras clave: rodopsina, fotorreceptor, intensidad lumínica, cinética, absorbancia.



GRAU EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

RESPOSTA DEL FOTOPIGMENT RODOPSINA A DIFERENTS INTENSITATS LUMÍNiques

RESUM

La rodopsina és un fotopigment, concretament una glicoproteïna integral de membrana que pertany a la família dels receptors acoblats a proteïnes G (GPCR). Té la funció de detectar els fotons i de respondre a un estímul lluminós.

A partir de l'experiment realitzat en el que vam utilitzar rodopsina bovina i la vam il·luminar directament sota diferents intensitats en períodes de temps mesurats s'ha pogut comprovar que en un període curt de temps (5s) es pot arribar pràcticament al blanquejament total del fotorreceptor.

En canvi quan aquest és sotmesa a una intensitat de il·luminació mínima la quantitat d'absorbància anirà disminuint progressivament, aquest comportament ens confirma la seva funció de fotorreceptor que treballa en condicions de baixa il·luminació.

Paraules clau: rodopsina, fotorreceptor, intensitat lumínica, cinètica, absorbància.



GRAU EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

RESPONSE OF PHOTOPIGMENT RHODOPSIN TO DIFFERENT INTENSITY LIGHTS

SUMMARY

Rhodopsin is a photopigment, specifically an integral membrane glycoprotein belonging to the family of G protein-coupled receptor (GPCR). Its function is to detect photons and respond to a light stimulus.

From the experiment in which has been used bovine rhodopsin and has been lit directly under different intensities in periods measured time it has been shown that in a short time (5s) period can reach virtually the total bleaching photoreceptor.

However when it is subjected to a minimum illumination intensity the amount of absorbance gradually diminishes, this behavior confirms its photoreceptor function that works in low light conditions.

Keywords: rhodopsin, photoreceptor, light intensity, kinetic, absorbance.

Summary

This TFG is basically the study, by experiment, the behavior rhodopsin when subjected to different light intensities. For this we look at the spectral change that occurs in the visible.

The work is divided into two parts: the first mainly discuss the theoretical part of rhodopsin, function, structure, location and other information. This will allow us to know the current state of knowledge of the photoreceptor. In the second part we find the experiment that is the fundamental part in this project is based. In this section which will be described in detail is the behavior of rhodopsin when exposed to four different light intensities, maximum, minimum and two intermediate.

Rhodopsin we can say that this is a photopigment, an integral membrane glycoprotein monomer belonging to the family of G-protein coupled receptors (GPCRs). Its main function detecting particles of light, photons, when they reach the retina of vertebrate animals and to respond to this physical stimulus.

This protein can be found on the inner segment of the rods and in terms of its structure could be defined as a polypeptide chain of 348 amino acids formed by a protein part (opsin) and a non protein portion that is a derivative of vitamin A (11-cis-retinal). Through various studies in mammals, we have observed that in their sticks containing about 800 membranous discs with an orderly arrangement one above the other with the practical purpose of increasing the entire surface area.

If we talk more of three dimensional structure we will consider that we will find a number of technical difficulties, if in the case of most proteins can be obtained by crystallization with x-ray diffraction to determine the structure, in the case of proteins rhodopsin membrane as has been achieved much lesser extent especially because the difficulty of obtaining large enough crystals. But laboratories are using new additives and new techniques, which will improve the results. For example it has

been able to form crystals of rhodopsin by extraction disks membranous through polyoxyethylene sorbitan weak detergents. This improves both the reproducibility and quality of the extracted samples.

Rhodopsin has a three dimensional ellipsoid structure where the domain transmembranous is determined drawing a parallel to the membrane where external hydrophobic residues change to polar plane. Non protein portion of the protein (11-cis-retinal) is attached to one of the helices of the molecule to be excited when it detects a photon of light that triggers a chemical reaction that will lead to a nerve impulse that leads vision.

The photopigment rhodopsin is in the eye, specifically within membranous discs of rod outer segment. Rods are specialized cells that work in low light conditions that provide vision in black and white and the perception of motion. These cells are positioned across the surface of the retina except the fovea. Although responds to stimuli general area are very sensitive since cells can be stimulated by the energy of one single photon.

The retina is an area with a very high metabolic activity, fortunately has an effective way to protect and renew all these cells and prevents retinal degeneration of the entire mechanism. The rollover mechanism is the release of the membranes are located at the ends of the photoreceptor, which then will become phagocytosed by the retinal pigmented epithelium. The lifetime of the discs of the rods is about 10 days and are continually renewed by new segments.

For proper sensitivity to light, the retina need not regenerate rhodopsin protein part (11-cis-retinal). This regeneration results in two cell systems: in the photoreceptor layer and the retinal pigmented epithelium. In the case of an incorrect feedback or a mutation may occur diseases such as pigment retinitis.

As discussed above one single photon it can be grasped by a stick getting excited and resulting in a response. This reaction takes place thanks to the photoreceptors have a chemical process called cascade that amplifies the displacement million sodium ions to canes obtain a high sensitivity in the dark.

This process would follows: 1 photon causes activation of rhodopsin. Metarhodopsin II activates transducin (inactive enzyme localized in the membrane of the disc and on the cell membrane cane), it in turn activates phosphodiesterase conducting cGMP hydrolysis is that keeps open the Na⁺ channel when intact and attached. Then when the sodium channels rhodopsin kinase inactive close rhodopsin and reverses the whole process.

Now that we have made the introduction of rhodopsin we talk about the purpose of work, we have decided to analyze the kinetics of the response of rhodopsin when illuminated with a FIBER-LITE lamp MI-150 (Dolan-Jenner) using different intensities. Among the tools and materials that need to emphasize: FIBER-LITE lamp MI-150 (Dolan-Jenner), spectrophotometer UV-Vis Cary (100Bio) with dual beam and rhodopsin coming from bovine retinas.

Having performed the experiment we will discuss the graphs obtained. What we can see is the kinetics of rhodopsin with different light intensities. To improve the comparison we have chosen the data from the two ends giving the light source: maximum illumination and minimum illumination. In addition also we discuss a graph of the normalized values taking into account all the values of the light source.

We also mentioned that the experimental conditions are different from an animal retina, in this case is totally isolated and in the case of the retina it is with other proteins and other components. Also commented that the results are determined from a single taking action, it would be advisable repeat the experiment three times for more reliable results.

In the first graph we see the behavior rhodopsin when illuminated using the maximum intensity. We can see that in the first period of 5 seconds photopigment absorbance level has dropped dramatically reaching almost all. The following measures can be seen that the levels continue to fall although much more slowly since virtually its absorbance is 0.

In the second graph with a low intensity we made further steps because we want to know the behavior of rhodopsin in this situation. Unlike the first graphic we can see that the absorbance capacity of rhodopsin goes down very gradually while it is illuminated. This confirms that the photo pigment rhodopsin is designed to work in low light conditions.

Finally in the third graph we can observe all measures standard values: minimum, maximum and two middle. The conclusion drawn is that the maximum intensity in the first 20 seconds and is virtually absorbance values 0, however in the case of the minimum illumination intensity of its change over time is much slower. We can observe some bad results in this illumination, probably because of human error in the experiment.

Finally as conclusions of the work we can say from the results that the illuminated rhodopsin photopigment with FIBER-LITE MI-150 (Dolan-Jenner) lamp under conditions of maximum illumination intensity over a period of 5 seconds can whiten protein and under low illumination intensity, the degree of absorbance of the protein is reduced in a progressive way, reaffirming its status photoreceptor us working in scotopic conditions.

Prefacio

Los intereses generales de este TFG es conocer el comportamiento del fotorigmento por dos vías: la primera a través de una búsqueda bibliográfica extraída mayoritariamente de artículos científicos de donde podremos extraer toda la parte teórica y otra parte práctica para cuantificar la excitación de la rodopsina.

Gracias a la investigación de estos últimos 30 años, actualmente se dispone de una información considerable sobre la estructura y función del fotorigmento que nos permite conocer mejor su funcionamiento, junto con la parte experimental intentaremos ampliar estos datos para una situación particular: que sea iluminada con diferentes intensidades.

Agradecimientos

En primer lugar quiero mostrar mi agradecimiento a la Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa y a todo el personal de la universidad por brindarme los conocimientos necesarios para llegar a la culminación del grado con este TFG.

A mi tutora del trabajo, la profesora Margarita Morillo Cazorla junto con el profesor Pere Garriga por toda la colaboración recibida.

A la Universitat Politècnica de Catalunya por permitirme utilizar los recursos necesarios para la realización de las pruebas en el Edifici Gaia.

Por último agradecimientos a Elizabet Pérez y Jaume Escofet por permitir la realización de los espectros de la lámpara.

Listado de ilustraciones

Figura 1. La estructura de la opsina obtenida a bajo pH representa una forma activa de la rodopsina. [The structure and function of G-protein-coupled receptors , Junio 2002]	16
Figura 2. Modelo Tridimensional de la Rodopsina. [Modelo Tridimensional de la Rodopsina, Ver y Oir, Junio 2012]	19
Figura 2. Estructura de la retina [Chemistry and Biology of Vision: Introduction, diciembre 2011]	20
Figura 3. Discos de membrana del segmento externo de los bastones [Chemistry and Biology of Vision: Introduction, diciembre 2011]	21
Figura 4. Regeneración de los Bastones [kishore a k, biologywriteup.blogspot.com.es]	22
Figura 5. El ciclo de retinoide regenera el cromóforo pigmento visual 11-cis-retinal [Chemistry and Biology of Vision, Noviembre 2011]	24
Figura 6. Papel de la Rodopsina en el ciclo bioquímico de la transducción visual. [Rhodopsin: Structural Basis of Molecular Physiology, October 2001]	25
Figura 7. Potencial del Receptor: Hiperpolarización-Cascada Amplificadora [docs.google.com/presentation/D/1xsncrwfbmibx1fnv0vrdf]	26
Figura 8. Iluminador MI-150 [Manual de operación Fiber-Lite]	29
Figura 9. PR-705/715 SpectraScan Systems [Manual de operación Photo Research]	30
Figura 10. Gráfica con el espectro de la lámpara a máxima intensidad con y sin filtro	31
Figura 11. Tabla de irradiancias a una distancia de la muestra de 5mm	31
Figura 12. Espectros de absorción UV-visible a 20°C de la Rodopsina iluminada con la lámpara FIBER-LITE MI-150 (Dolan-Jenner) utilizando la intensidad máxima a diferentes tiempos.	33
Figura 13. Espectros de absorción UV-visible a 20°C de la Rodopsina iluminada con la lámpara FIBER-LITE MI-150 (Dolan-Jenner) utilizando la intensidad mínima a diferentes tiempos.	35
Figura 14. Valores normalizados de la absorbancia a 500nm de la rodopsina iluminada con la lámpara FIBER-LITE MI-150 (Dolan-Jenner) a CUATRO INTENSIDADES LUMÍNICAS	37
Figura 15. Datos Técnicos Iluminador Fiber-Lite Series MI-150	41

Sumario

1. Introducción	15
1.1. La rodopsina. Función y estructura	16
1.2. Estructura tridimensional de la Rodopsina	18
1.3. Localización de la Rodopsina	20
1.4. Renovación de los fotorreceptores	22
1.5. Regeneración del cromóforo: ciclo del retinoide	24
1.6. Fototransducción	25
1.7. Cascada química amplificadora	26
2. Objetivo	27
3. Materiales y métodos	28
3.1. Fuente de iluminación	29
3.2. Spectre Scan	30
4. Resultados	32
4.1. Cinética de la Rodopsina bajo intensidad máxima	33
4.2. Cinética de la Rodopsina baja intensidad mínima	35
4.3. Valores normalizados de Absorbancia	37
5. Conclusiones	39
6. Bibliografía	40
7. Anexos	41

1. Introducción

En el presente trabajo de fin de grado se desarrolla un estudio sobre la respuesta del fotorpigmento rodopsina o púrpura visual cuando es sometida a diferentes intensidades y valoraremos su cambio espectral en el visible.

En primer lugar el trabajo consiste en una parte teórica que nos permitirá ubicar la actual situación de los conocimientos de la rodopsina a nivel científico. Hablaremos de diferentes aspectos descriptivos del fotorpigmento como su función o estructura.

En segundo lugar describiremos brevemente mediante un experimento el blanqueamiento del fotorpigmento cuando es estimulado por la luz modificando de forma controlada la intensidad y finalmente con todos los datos obtenidos estudiaremos su comportamiento.

1.1. La rodopsina. Función y estructura

La rodopsina es un fotopigmento, concretamente una glicoproteína monomérica integral de membrana que pertenece a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Su función es la de detectar los fotones que llegan a la retina de los vertebrados, es decir, responder al estímulo físico de la luz.

Este receptor se forma en el segmento interno de los bastones, sintetizándose en el retículo endoplasmático para pasar hacia las membranas de Golgi donde se transforma en glicosiladas. Estas vesículas que contienen la rodopsina se trasladan al segmento exterior donde se fusionan con la membrana plasmática del fotorreceptor. La podemos definir como una cadena polipeptídica de 348 aminoácidos con un peso molecular de unos 40 KDa aproximadamente y está formada por una parte proteica (opsina) y una parte no proteica que es un derivado de la vitamina A (11-cis-retinal). Diversos estudios llevados a cabo en animales, primero conejillos de indias, ranas y finalmente ratones, nos dan una idea de que éstos contienen alrededor de 800 discos membranosos apilados uno encima de otro aumentando de esta manera el total del área superficial.

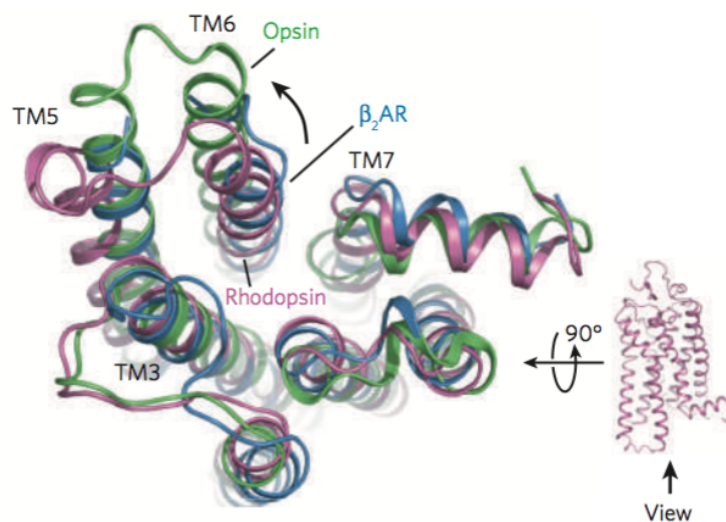


FIGURA 1. LA ESTRUCTURA DE LA OPSINA OBTENIDO A BAJO PH REPRESENTA UNA FORMA ACTIVA DE LA RODOPSINA. [THE STRUCTURE AND FUNCTION OF G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS , JUNIO 2002]

Después de la fotoactivación, la rodopsina cumple su función bioquímica celular en el fotorreceptor mediante la interacción con otras proteínas de los bastones a través de su superficie citoplasmática. En su ciclo funcional la rodopsina interactúa con tres proteínas principales: la transducina, la rodopsina quinta y la arrestina, luego finalmente se relaciona con la fosfatasa para su desfosforilización.

1.2. Estructura tridimensional de la Rodopsina

Una parte clave para determinar los mecanismos de acción y entender cómo lleva a cabo la rodopsina sus funciones es conocer la estructura tridimensional. Para la mayoría de las proteínas se ha logrado conocer su estructura tridimensional mediante la cristalización de las proteínas y la determinación de sus estructuras mediante difracción de rayos X.

En el caso de las proteínas de membrana como la rodopsina, sólo se ha obtenido la estructura tridimensional de unas pocas debido en gran parte a una serie de dificultades técnicas. Por ejemplo primero han de ser solubilizadas en detergentes, y diversos experimentos ha demostrado que es difícil obtener cristales suficientemente grandes. Sin embargo la perspectiva para obtener resultados ha ido mejorando, en la actualidad se están haciendo progresos en diversos laboratorios en el área de preparación de la muestra mediante aditivos crioprotectores y en el área de la cristalización a través del uso de la radiación con haz microfoco aumentando la producción de cristales más grandes y la mejora en los métodos de análisis de datos.

Hablando propiamente de la estructura tridimensional, la rodopsina presenta una estructura elipsoide donde el dominio transmembrana se determina trazando un plano paralelo a la membrana donde los residuos externos cambian de hidrofóbicos a polares. Dentro de la membrana del bastón se encuentra posicionado su grupo carboxilo terminal contactando con el citoplasma celular a la vez que el grupo amino proteínico se encuentra entre la membrana de los discos. La parte no proteica (11-cis-retinal) está unido a una de las hélices alfa de la molécula para poder ser excitado por el fotón de luz dando lugar a una reacción química que termina en un impulso nervioso que conduce a la visión.

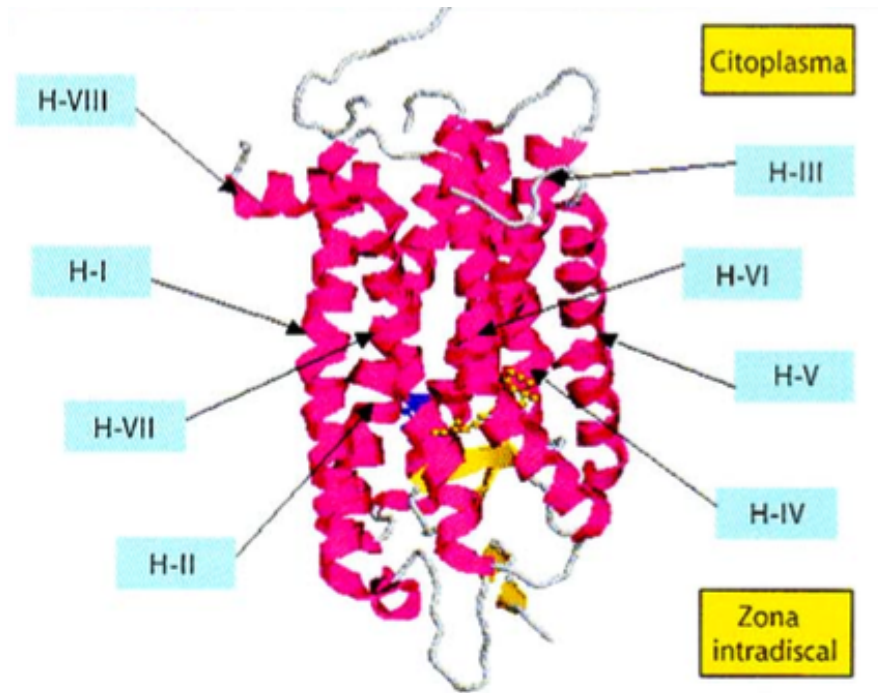


FIGURA 2. MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA RODOPSINA. [MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA RODOPSINA, VER Y OIR, JUNIO 2012]

A través de diversos experimentos ha sido posible obtener información de las proteínas de membrana de las ranas donde se observan estructuras organizadas de cristales de dos dimensiones. Es posible conseguir la formación de cristales de rodopsina mediante su extracción de los discos membranosos gracias a detergentes débiles de polioxietileno sorbitán. Estas condiciones de optimización han conseguido mejorar la reproducibilidad , rendimiento y calidad de la muestra extraída.

1.3. Localización de la Rodopsina

El fotorreceptor rodopsina se encuentra dentro del ojo, que es el órgano que nos permite la capacidad de interpretación del entorno de manera continua gracias a los rayos de luz que llegan a él.

Este órgano situado en la cavidad orbitaria está constituido por tres capas:

- La capa externa: córnea y esclerótica
- La capa media : iris, cuerpo ciliar, tejido conjuntivo y coroides
- La capa interna: retina

En la retina es donde se dan los eventos de absorción primaria, esta estructura compleja está compuesta por múltiples capas de neuronas interconectadas mediante sinapsis.

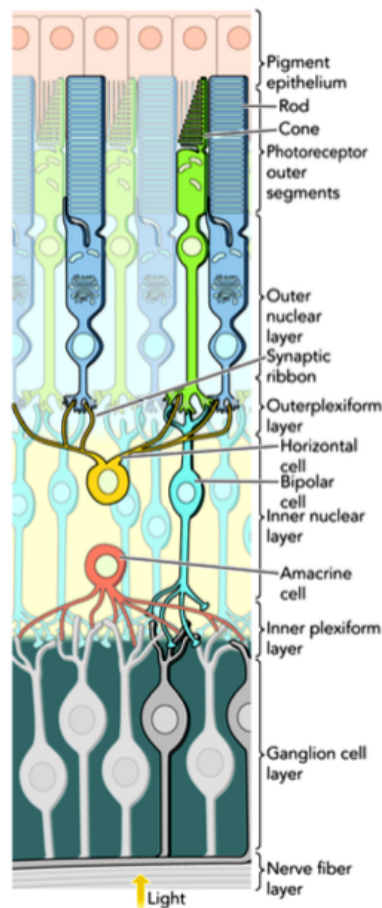


FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LA RETINA [CHEMISTRY AND BIOLOGY OF VISION: INTRODUCTION, DICIEMBRE 2011]

Las proteínas encargadas de la fototransducción visual se encuentran mayoritariamente en la membrana de los segmentos externos de la capa de fotorreceptores de la retina, que consta de dos componentes: los conos, mucho más numerosos, especialmente adaptados para trabajar en situaciones con alta luminosidad y proporcionan la visión en color y los bastones, menos numerosos, que funcionan en condiciones de baja luminosidad proporcionando la visión en blanco y negro y la percepción del movimiento.

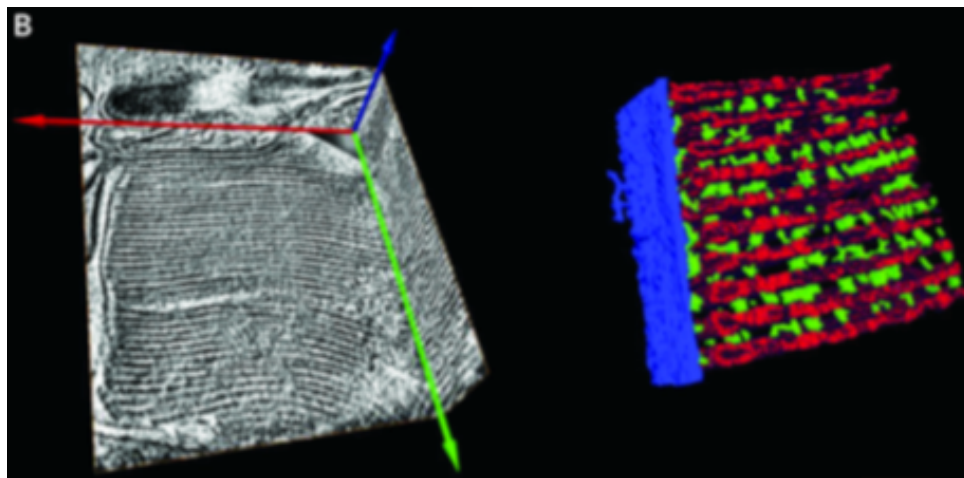


FIGURA 3. DISCOS DE MEMBRANA DEL SEGMENTO EXTERNO DE LOS BASTONES [CHEMISTRY AND BIOLOGY OF VISION: INTRODUCTION, DICIEMBRE 2011]

Los bastones contienen la proteína rodopsina y se posicionan por toda la superficie de la retina a excepción de la fovea, que responden a estímulos de un área general, aunque sin capacidad de discriminar pequeños detalles como en el caso de los conos. A pesar de eso, son unas células altamente sensibles al poder ser estimulados por la energía de un solo fotón, proporcionando la visión escotópica. Morfológicamente son de apariencia alargada y más delgados que los conos, están formados por el pedículo sináptico, núcleo, segmento interno y segmento exterior formado por discos membranosos aislados de la membrana plasmática donde se encuentra alojado el fotorpigmento ocupando alrededor del 50% del volumen de la membrana dentro de los discos. Esta alta densidad se justifica para aumentar la probabilidad de absorción de fotones.

1.4. Renovación de los fotorreceptores

Los conos y bastones se encuentran constantemente expuestos a la luz junto con altos niveles de oxígeno. Gracias a un eficaz proceso de protección y renovación de estas células no se da lugar a una degeneración de toda la retina, ya que estas células contienen retinoides altamente reactivos junto con altos niveles de fosfolípidos insaturados.

El mecanismo para llevar a cabo esta renovación de las estructuras es el desprendimiento de las membranas de los extremos más apicales, que pasan a ser fagocitados posteriormente por el epitelio pigmentado de la retina produciendo un fagosoma. El promedio de vida de los discos se encuentra alrededor de unos 10 días. Éstos son renovados por nuevos segmentos continuamente.

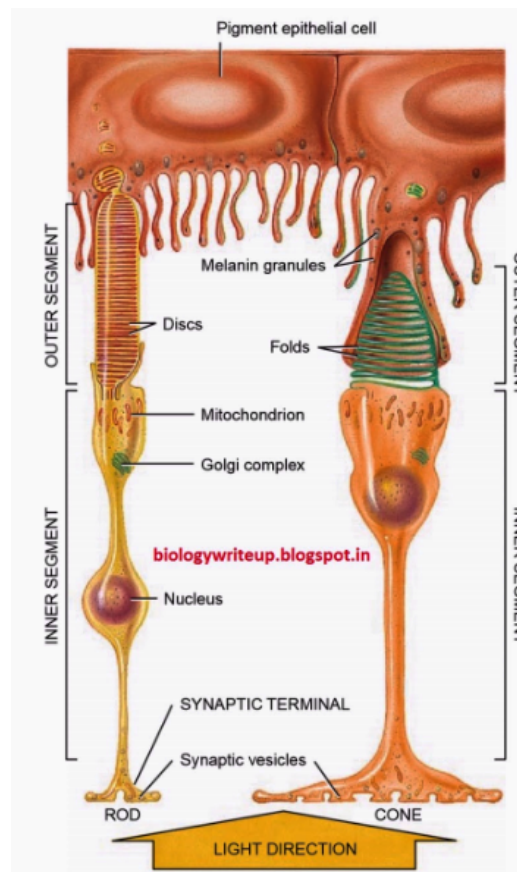


FIGURA 4. REGENERACIÓN DE LOS BASTONES [KISHORE A K, BIOLOGYWRITEUP.BLOGSPOT.COM.ES]

La parte fagocitada, que se encuentra recubierta de una membrana de plasma, se somete a un proceso de reciclaje mediante mecanismos de fusión con los endosomas y lisosomas, donde los lípidos y los retinoides insaturados son reutilizados incorporándose como nuevos discos de membrana del fotorreceptor. Según estudios de Young y Droz (1968) pudieron determinar que a lo largo del día y según la especie, los discos se reemplazan con un promedio de 25 a 36 diarios. Es decir, que cada célula del epitelio pigmentado puede llegar a fagocitar de 2000 a 4000 discos de membrana.

Por este motivo el epitelio pigmentado de la retina es considerada una región con una actividad metabólica muy alta ya que los fotorreceptores dependen de esta capa para su mantenimiento y supervivencia. Por citar un ejemplo, en la fóvea, que es la zona más activa metabólicamente de la retina, cada célula del EPR debe envolver 4×10^8 moléculas de rodopsina diariamente. Debido a tal índice de actividad en una zona concreta, alrededor de la fóvea, como consecuencia esta región de la retina es la primera en sufrir degeneraciones durante el DMAE.

1.5. Regeneración del cromóforo: ciclo del retinoide

El proceso para que la retina se mantenga sensible a la luz y así se de lugar la visión, se debe a la correcta regeneración del 11-cis-retinal que se isomeriza (uno de los procesos más rápidos conocidos, del orden de los femtosegundos). Esta regeneración se da lugar en dos sistemas celulares: en la capa de los fotorreceptores y en el epitelio pigmentado de la retina que debe llevarse en un ambiente membrana-acuoso a temperatura corporal.

Por otra parte este proceso conlleva un elevado flujo de fotones que llegan a la retina, y su excesiva exposición a la luz que puede derivar en elevadas cantidades de metabolitos tóxicos que tienden a acumularse a lo largo de la vida e incluso puede derivar en la degeneración de los fotorreceptores. Una incorrecta regeneración o en su caso alguna mutación en el gen puede ser una de las causas más comunes en la retinosis pigmentaria

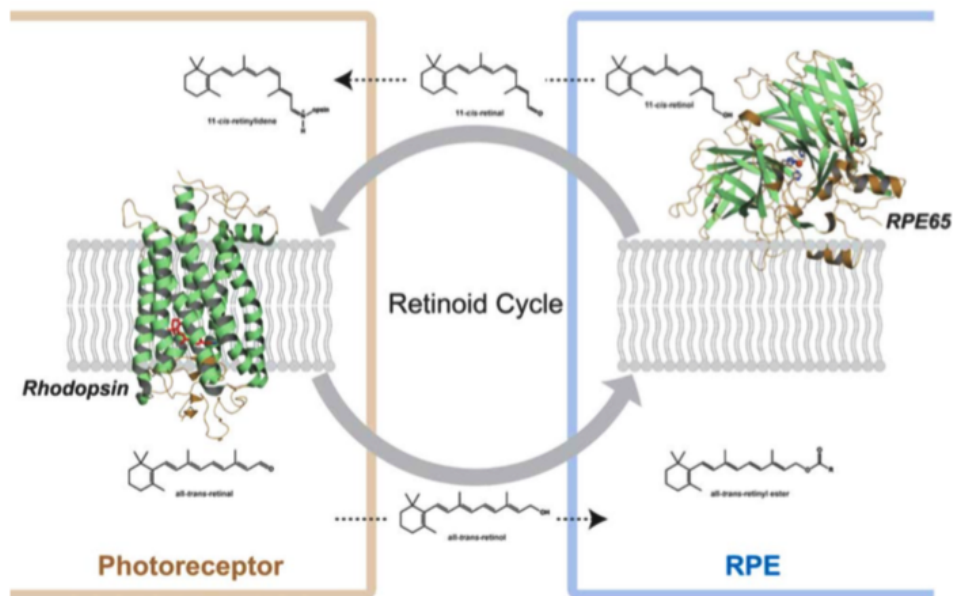


FIGURA 5. EL CICLO DE RETINOIDE REGENERA EL CROMÓFORO PIGMENTO VISUAL 11-CIS-RETINAL [CHEMISTRY AND BIOLOGY OF VISION, NOVIEMBRE 2011]

1.6. Fototransducción

En situaciones escotópicas los receptores de la retina liberan glutamato al encontrarse parcialmente despolarizados debido a la presencia de canales abiertos de Na. Estos canales son regulados por nucleótidos de GMPc que tiene niveles elevados en situaciones de oscuridad por lo que se dispone de un flujo continuo de Na hacia el interior.

Cuando la luz es proyectada se activa el fotorpigmento y el protón que es absorbido por el retinal, éste se disocia de la opsina. Una vez se activa, activa a su vez a proteínas G que releva la señal a una enzima efectora, la fosfodiesterasa que se encarga de romper el gen ubicado en el citoplasma de los receptores bajando los niveles del GMPc. Si los niveles del gen bajan, los canales de Na dependientes del gen específico se cierran hiperpolarizando la membrana. Por consecuencia en presencia de luz la membrana del fotorreceptor se hiperpolariza.

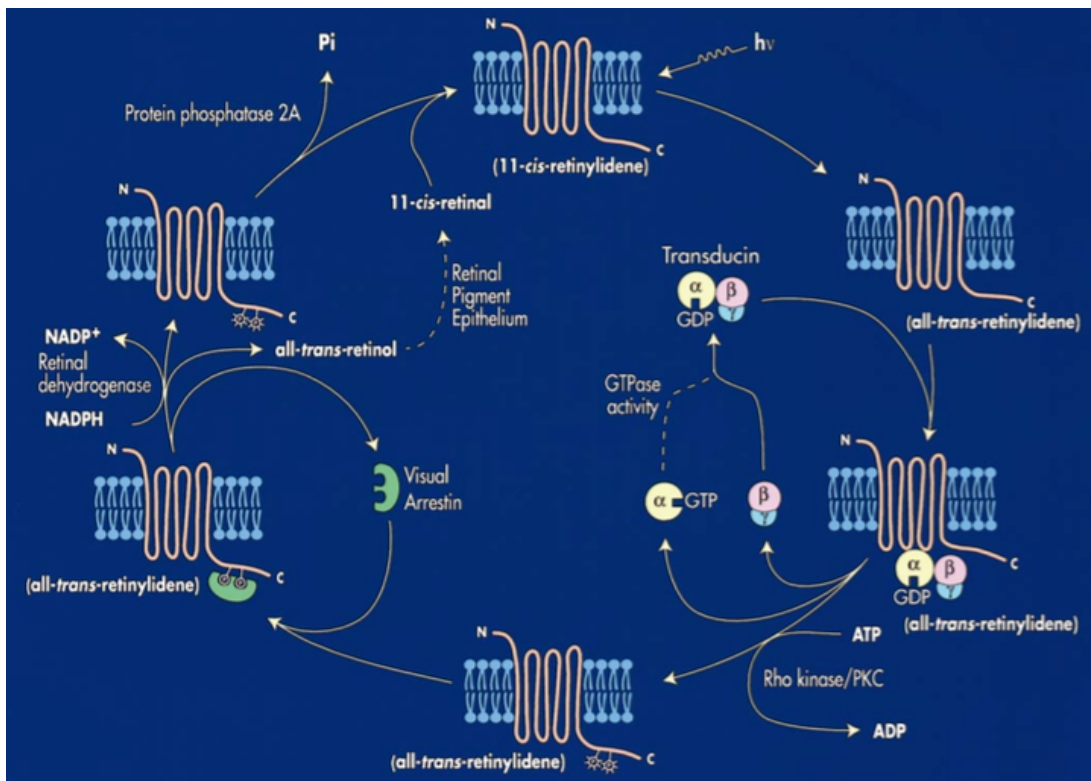


FIGURA 6. PAPEL DE LA RODOPSINA EN EL CICLO BIOQUÍMICO DE LA TRANSDUCCIÓN VISUAL.
[RHODOPSIN: STRUCTURAL BASIS OF MOLECULAR PHYSIOLOGY, OCTOBER 2001]

1.7. Cascada química amplificadora

Como se ha comentado anteriormente 1 solo fotón puede ser captado por un bastón excitándose y dando lugar a una respuesta. Esta reacción se da lugar gracias a que los fotorreceptores tienen un proceso denominado cascada química que amplifica el desplazamiento millones de iones sodio para que los bastones obtengan una elevada sensibilidad en la oscuridad.

Esta cascada se produce como procesos catalíticos en la interfaz de las membranas de disco y el citoplasma (catátesis interfacial). Este proceso se daría de la siguiente forma: 1 fotón produce la activación de la rodopsina. La metarodopsina II activa la transducina (enzima inactiva localizada en la membrana de los discos y en la membrana celular del bastón), ésta a su vez activa la fosfodiesterasa llevando a cabo la hidrólisis de GMPc que es el que mantiene abierto el canal Na^+ cuando está intacto y unido. Luego cuando los canales de sodio se cierran la rodopsina cinasa inactiva la rodopsina e invierte todo el proceso.

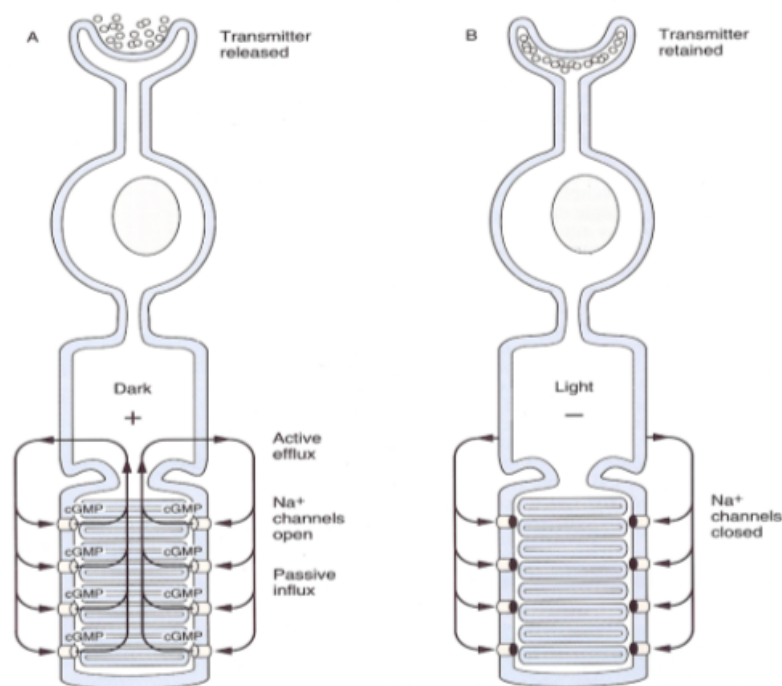


FIGURA 7. POTENCIAL DEL RECEPTOR: HIPERPOLARIZACIÓN-CASCADA AMPLIFICADORA
[DOCS.GOOGLE.COM/PRESENTATIO/D/1XSNCRWFBMIBX1FNV0VRDTF]

2. Objetivo

El objetivo que planteamos en el siguiente TFG es:

- Analizar la cinética de la respuesta de la rodopsina al ser iluminada con una lámpara FIBER-LITE MI-150 (Dolan-Jenner) utilizando diferentes intensidades.

3. Materiales y métodos

En esta segunda parte del TFG describiremos la realización y los resultados obtenidos. Empezaremos describiendo las características del equipo utilizado para llevar a cabo las pruebas y seguidamente pasaremos a comentar las gráficas de la absorción de la rodopsina con diferentes intensidades lumínicas.

Los espectros de absorción UV-Visible se obtuvieron con un Espectrofotómetro UV-Vis Cary (100Bio) de doble haz. La rodopsina utilizada procedía de retinas bovinas y se encontraba en tampón HEPES 100 mM pH7,4 (conteniendo un 0,05% DM, Dodecil Maltósido) (Anatrace) (HEPES: ácido [N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico]).

También se utilizó un controlador de temperatura Peltier; Cary.

Baño termostático de agua DARLAB.

Lámpara con filtro rojo.

3.1. Fuente de iluminación



FIGURA 8. ILUMINADOR MI-150 [MANUAL DE OPERACIÓN FIBER-LITE]

Fiber-Lite® MI-150 es un iluminador óptico de cuarzo halógeno de 150 Vatios diseñado para uso general con microscopios. Cuando se usa con cables especiales de fibra óptica, el iluminador MI-150 también se puede emplear en otras aplicaciones de iluminación de laboratorio. Todos los iluminadores de la serie MI-150 están equipados con un controlador de intensidad de estado sólido manual en el panel frontal. La posición "0" (cuando el controlador es girado completamente en el sentido opuesto al de las agujas del reloj) corresponde a la intensidad de luz más baja del iluminador. La posición "100" (cuando el controlador es girado completamente en el sentido de las agujas del reloj) corresponde a la intensidad más alta del iluminador.

3.2. Spectre Scan



FIGURA 9. PR-705/715 SPECTRASCAN SYSTEMS [MANUAL DE OPERACIÓN PHOTO RESEARCH]

Spectrescan es un espectrorradiómetro es un instrumento que mide la radiación de luz entrante, así como la reflectancia y la transmitancia en un rango espectral, es decir, permite medir la intensidad cuantitativa o absoluta en diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético.

Como características podemos citar:

- Luminancia: iluminancia opcional, regulación de flujo y de intensidad luminosa
- Radiancia: irradiancia opcional, regulación de flujo y de intensidad de radiancia
- 1931 CIE x,y - 1976 u',v'
- Valores tricromáticos (CIE 1931 X, Y, Z)
- Correlated Color Temperature
- Temperatura de color correlacionada
- Infrarrojo cercano (PR-715)

A continuación mostraremos el espectro de la luz producida por la lámpara FIBER-LITE MI-150 (Dolan-Jenner) con filtro $\lambda > 495$ nm y sin filtro. El espectro se obtuvo con un Spectre Scan PR715 Spectroradiometer de Photo Research y la tabla de irradiancia para las distintas posiciones de la lámpara a una distancia de la muestra de 5mm.

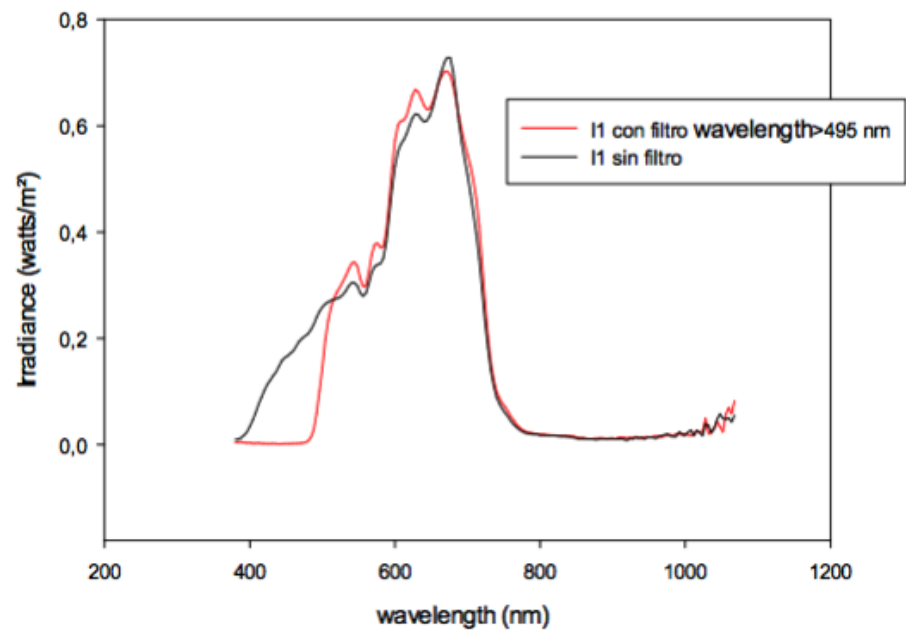


FIGURA 10. GRÁFICA CON EL ESPECTRO DE LA LÁMPARA A MÁXIMA INTENSIDAD CON Y SIN FILTRO

Sin filtro	I1 (máx)	I2	I3(media)	I4 (mínima)
Irradiance (watts/m ²)	1,81E+02	1,30E+02	2,21E+01	4,78E+00
Photon Irrad. (photons/m ² /sec)	5,69E+20	4,07E+20	7,11E+19	1,56E+19
Con filtro	I1 (máx)	I3(media)		
Irradiance (watts/m ²)	1,20E+02	3,03E+01		
Photon Irrad. (photons/m ² /sec)	3,92E+20	9,98E+19		

FIGURA 11. TABLA DE IRRADIANCIAS A UNA DISTANCIA DE LA MUESTRA DE 5MM

4. Resultados

Una vez explicados los detalles de los instrumentos utilizados en el experimento, pasaremos a comentar las gráficas obtenidas.

En las gráficas siguientes observaremos la cinética de la rodopsina con diferentes intensidades lumínicas. Para que la comparativa sea más visible hemos escogido los valores obtenidos los dos extremos que nos ofrece la fuente de iluminación: en el caso de la primera comentaremos el comportamiento bajo la condición de una iluminación máxima, en la segunda bajo una iluminación mínima y por último ofrecemos un gráfico en el que podremos observar los valores normalizados de la absorbancia teniendo en cuenta además de la intensidad mínima y máxima dos valores intermedios.

Hemos de tener en cuenta que estas pruebas están realizadas en unas condiciones totalmente diferentes que la que se encuentra en una retina animal, ya que en este caso se encuentra totalmente aislada y en el caso de la retina la encontramos junto con más proteínas entre otros componentes. Además de eso hubiese sido necesario repetir más de una vez la toma de medidas en todas las intensidades para obtener una media con un valor más fiable ya que los resultados presentes han sido obtenidos en una única prueba.

4.1. Cinética de la Rodopsina bajo intensidad máxima

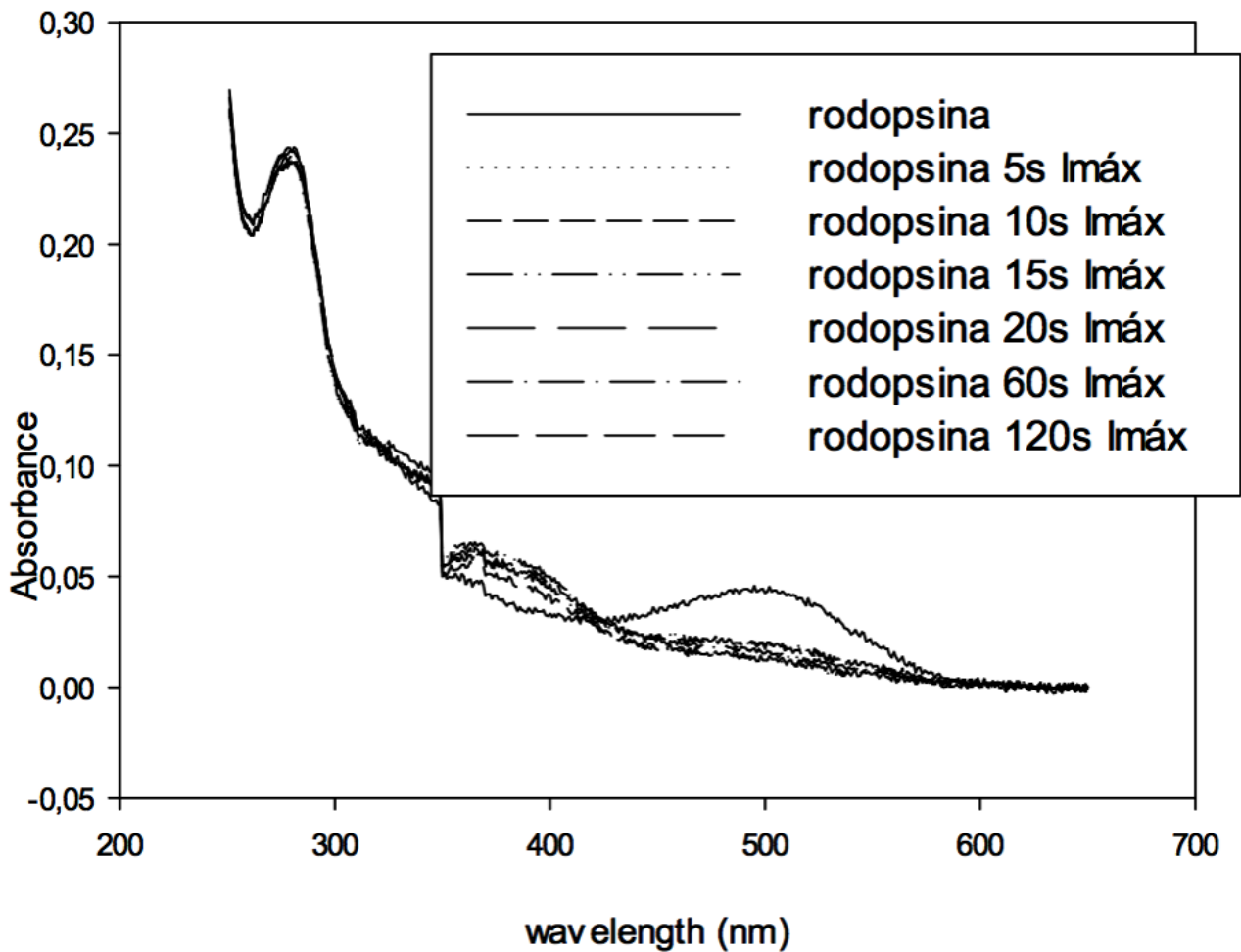


FIGURA 12. ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE A 20°C DE LA RODOPSINA ILUMINADA CON LA LÁMPARA FIBER-LITE MI-150 (DOLAN-JENNER) UTILIZANDO LA INTENSIDAD MÁXIMA A DIFERENTES TIEMPOS.

En esta primera gráfica se puede apreciar un comportamiento claro en la rodopsina, como hemos mencionado anteriormente el fotorreceptor presenta el pico más alto de absorbancia cuando la longitud de onda se sitúa dentro de los 500nm .

La condición del experimento es de un periodo de iluminación en rangos de 5 segundos hasta llegar a 20, a partir de ahí hemos iluminado la rodopsina hasta completar un minuto y finalmente también hemos valorado la absorbancia en un tiempo de dos minutos. En este caso al tratar con la iluminación máxima podemos observar que el nivel de

absorbancia en la primera medida, después de haberla iluminado durante 5 segundos el nivel de ésta ha bajado notoriamente, lo que nos indica que en gran parte ya está blanqueada en el lapsus de los primeros 5 segundos. Sin embargo el blanqueamiento no ha llegado a la totalidad ya que en las medidas siguientes con rangos de tiempo de 5 segundos hasta los 20 seg la rodopsina sigue blanqueándose gradualmente por lo que, aunque estemos hablando de valores muy pequeños aún encontramos algo de absorbancia por parte de la rodopsina.

En las dos últimas medidas que corresponden a 1 minuto y a la máxima de 2 minutos podemos observar que los niveles de absorbancia de la rodopsina aún siguen bajando aunque ya prácticamente se encuentran en el nivel 0, lo que significa que probablemente con un par de tomas de medidas ya habremos llegado al total blanqueamiento.

4.2. Cinética de la Rodopsina baja intensidad mínima

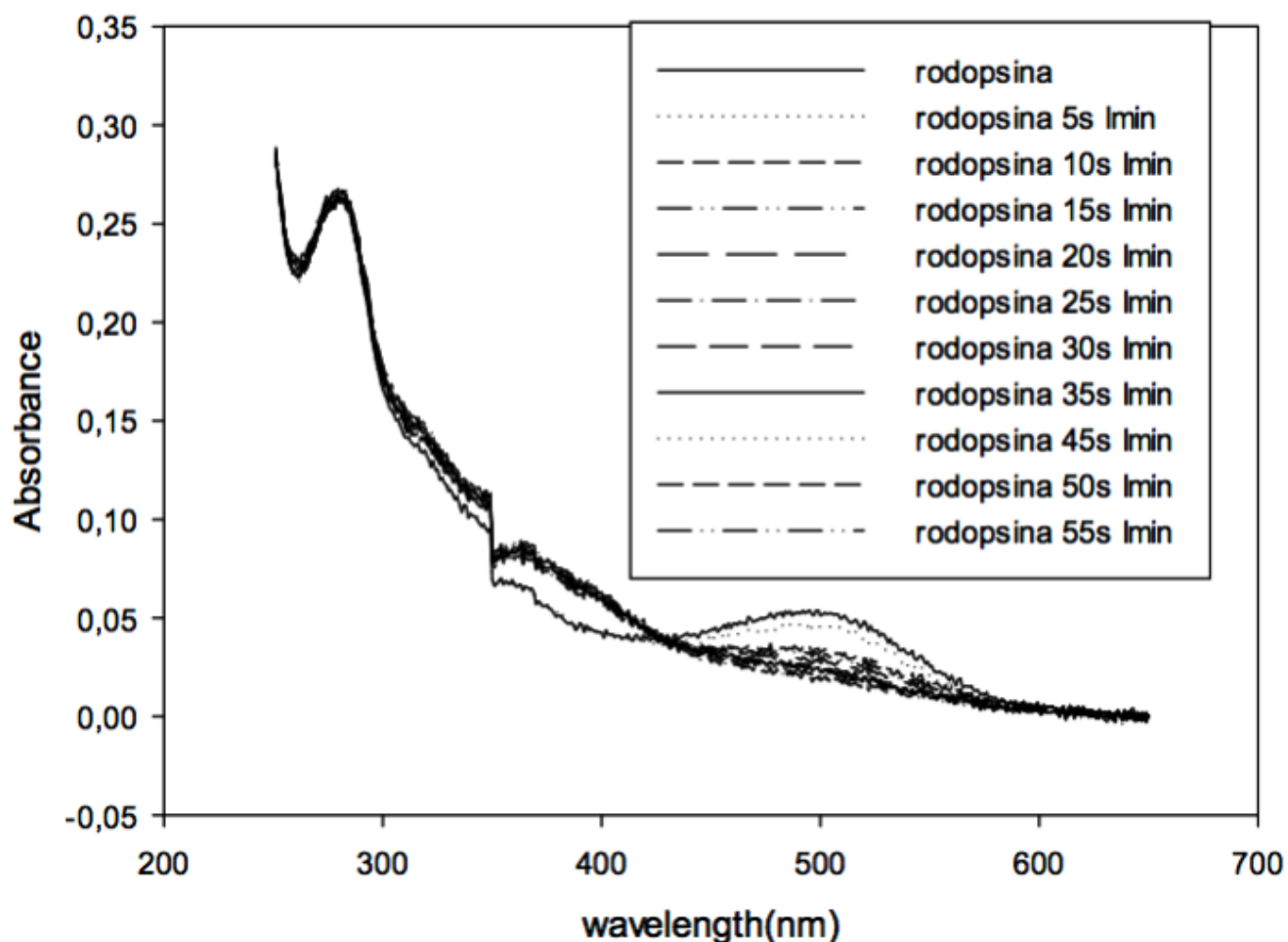


FIGURA 13. ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE A 20 °C DE LA RODOPSINA ILUMINADA CON LA LÁMPARA FIBER-LITE MI-150 (DOLAN-JENNER) UTILIZANDO LA INTENSIDAD MÍNIMA A DIFERENTES TIEMPOS.

En este caso nos pareció más interesante prolongar la toma de medidas en los rangos de 5 segundos hasta los 55 segundos porque los bastones, que son los fotorreceptores que contienen la rodopsina trabajan en condiciones de baja iluminación. De esta forma podremos ver de una manera más detallada la cinética de la proteína.

A diferencia de la gráfica anterior que en la primera medida tomada a los 5 segundos de ser iluminada, ésta había bajado en gran medida su capacidad de absorbancia en este caso se puede observar que el comportamiento a los 5 segundos el grado de blanqueamiento de la

rodopsina es bajo, lo que nos indica que condiciones de baja iluminación tarda más en blanquearse. A partir de los 10 segundos sí que se puede apreciar una caída significativa en la absorbancia pero que sin embargo no lleva a ser de la misma magnitud que con una iluminación máxima en la misma cantidad de tiempo.

En todas las tomas observadas cada 5 segundos podemos observar que los indicadores van bajando de una forma muy progresiva lo que indica que su grado de blanqueamiento con una intensidad mínima en el mismo tiempo (55 segundos) es mucho más lenta que en condiciones de intensidad máxima. También nos podemos dar cuenta de que a pesar de haber llegado a iluminarla 55 segundos aún no se acerca a los valores de 0 absorbancia. Podemos observar que se hubiese necesitado más tiempo en esta condición para llegar a la fase de blanqueamiento total de la proteína.

4.3. Valores normalizados de Absorbancia

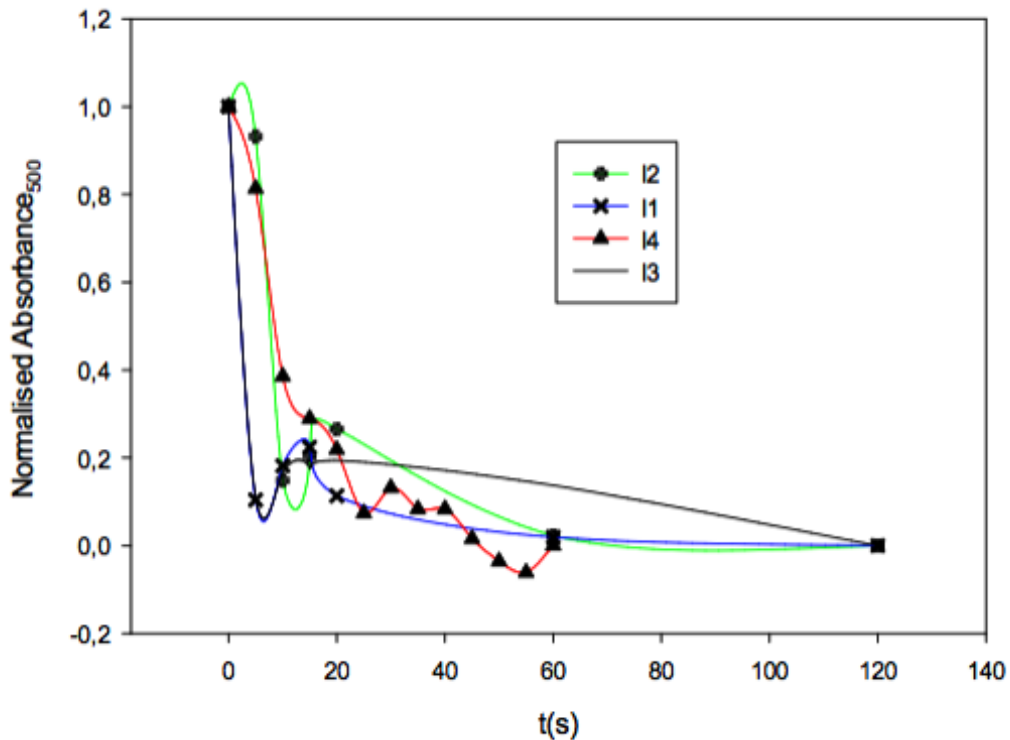


FIGURA 14. VALORES NORMALIZADOS DE LA ABSORBANCIA A 500NM DE LA RODOPSINA ILUMINADA CON LA LÁMPARA FIBER-LITE MI-150 (DOLAN-JENNER) A CUATRO INTENSIDADES LUMÍNICAS

En esta última gráfica se han normalizado los resultados de los valores obtenidos teniendo en cuenta cuatro intensidades lumínicas, dónde la intensidad 1 corresponde a la máxima, seguida de la 2 y la 3 y por último la 4 como intensidad mínima.

La información que podemos extraer es que en todas intensidades examinadas se aprecia un fuerte descenso, que llega prácticamente a la totalidad en el caso de la intensidad 1, en los niveles de absorbancia en los primeros 20 segundos de la prueba. A partir de allí los niveles van bajando progresivamente hasta acercarse a los valores de 0 absorbancia que corresponden con el blanqueamiento total de la rodopsina.

Hemos de comentar que en el caso de la línea de la intensidad 4 el comportamiento anómalo ya que a pesar de que los niveles de absorbancia

van bajando, lo que se encuentra dentro de lo esperado, en el punto situado alrededor de los 30 segundos podemos observar una incongruencia. En esa toma se aprecia un incremento en los niveles de absorbancia, en otra situación este valor nos podría indicar que ha habido una regeneración del fotorreceptor, pero en el experimento realizado esta justificación no es posible. La explicación a ese comportamiento anómalo seguramente se debe a un fallo humano en el momento de la toma de la medida. Lo recomendable sería repetir como un mínimo de tres veces las pruebas para hacer una media de los valores resultantes y así obtener unos valores medios más fiables.

5. Conclusiones

A partir del experimento realizado con la lámpara FIBER-LITE MI-150 (Dolan-Jenner) podemos obtener las siguientes conclusiones:

- En condiciones de iluminación a intensidad máxima, en un periodo de tiempo de 5 segundos, podemos llegar a blanquear la proteína.
- En condiciones de baja iluminación, el grado de absorbancia de la proteína se va reduciendo de una forma progresiva, lo que nos reafirma su condición de fotorreceptor que trabaja en condiciones escotópicas.

6. Bibliografía

Artículos de revistas

- Daniel M. Rosenbaum, Søren G. F. Rasmussen & Brian K. Kobilka (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *INSIGHT REVIEW*
- Isidoro Mario Pepe* (2001). Recent Advances in Our Understanding of Rhodopsin and Phototransduction. *PROGRESS IN RETINAL AND EYE RESEARCH*
- Krzysztof Palczewski (2001). Chemistry and Biology of Vision: Introduction. *MANUSCRIPT R111.301150*
- Krzysztof Palczewski *et al.* (2000). Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *SCIENCE*
- Santosh T. Menon, May Han and Thomas P. Sakmar (2001). Rhodopsin: Structural Basis of Molecular Physiology. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*
- Paul A. Hargrave (2001). Rhodopsin Structure, Function, and Topography. *INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE*.
- Eva Ramón, Jesús Gómez, Luis J. Del Valle, César Urtubia, Guadalupe Götzens, Pere Garriga (2002). Estructura Tridimensional de la Rodopsina. *VER Y OIR*.

Libros

- César Urtubia Vicario (1997). Neurobiología de la visión. *EDICIONES UPC* ISBN 9788483011638

7. Anexos

Datos técnicos

Fiber-Lite® Series MI-150

Lámpara	Halógeno de cuarzo de 150 W, 21V (EKE, EJV o EJA) de acuerdo a orden
Voltajes	115/60, 230/50 (ajustado en la fabrica)
Tiempo de vida de la lámpara	200-10,000 horas, dependiendo de la intensidad a la que trabaje
Fusible	115 VAC: 3 Amp, 250 V, retardo de tiempo, 5 x 20 mm 230 VAC: 3 Amp, 250 V, retardo de tiempo, 5 x 20 mm
Temperatura del color	3100-3400° grados Kelvin, dependiendo de la lámpara usada.
Nivel de ruido	aproximadamente 21 dB (A)
Aprobaciones de seguridad	115 VAC - UL & C-UL 230 VAC-CE
Dimensiones	6 in. L x 8.5 in. W x 5.3 in. H Alto x Ancho x Profundidad 15.3 cm L x 21.6 cm W x 13.5 cm H
Peso	7.75 lbs. (3.6 kg.)
Máxima temperatura de la caja	15° C sobre la temperatura ambiente.

Especificaciones de uso para condiciones ambientales

Tipo de uso	Interior, a una altitud máxima de 2,000 M
Rango de temperatura	5° C a 40° C
Humedad relativa	a 80% máximo hasta 31° C disminuyendo linealmente hasta 50% de humedad relativa a 40° C
Categoría de instalación	II
Grado de contaminación	2

FIGURA 15. DATOS TÉCNICOS ILUMINADOR FIBER-LITE SERIES MI-150

Specifications

Wavelength Range	PR-705: 380 - 780 nm PR-715: 380 - 1066 nm
Spectral Accuracy	PR-705: ± 2 nm PR-715: ± 4 nm
Spectral Bandwidth	≥ 2.5 nm. Bandwidth is dependent on aperture height and wavelength dispersion.
Available Apertures	2°, 1°, 1/2°, 1/4°, 1/8°. Select at time of purchase. Special horizontal aperture slits available.
Minimum Measuring Area	0.12 mm (0.005") with Standard MS-55 lens and 1/8° aperture 0.02 mm (0.001") with MS-5X lens and 1/8° aperture
Luminance Sensitivity for Illuminant A	0.003 cd/m ² (0.001 f) for 2° aperture and MS-55 lens
Luminance Accuracy	$\pm 2\%$ to NIST traceable luminance standard at 2856 K
Luminance Repeatability	The standard deviation of repeat measurements over a 30 minute period is less than 0.1%.
Color Accuracy for Illuminant A	PR-705: x $\pm .0015$ y $\pm .001$ PR-715: x $\pm .003$ y $\pm .002$
Color	$\pm .0005$ at a CCT of 2856 K
Repeatability	Less than 5% when measuring linearly polarized sources in the visible range
Visual Field of View	8.5° with the MS-55 lens
Interfaces	RS-232 (serial), IEEE-488 (parallel - optional), Printer (parallel)
Digital Resolution	16 bits
Power	100V - 240V AC / 50-60 Hz
Weight	12 lbs. 6 oz. with MS-55 lens
Operating Temperature	1° - 30° C (34° - 86° F)
Humidity	0 - 90% non-condensing

Sensitivity Chart

ACCESS.	DISTANCE	UNITS	APERTURE SIZE (DEGREES)				
			2°	1°	1/2°	1/4°	1/8°
MS-55	1.75 in. to ∞ (44 mm to ∞)	f^{I} (cd/m ²)	0.001-500 (0.003-1.7K)	0.003 2K (0.01-6.8K)	0.012-8K (0.04-27.4K)	0.048-32K (0.16-109.6K)	0.192-128K (0.66-438K)
MS-1X	3.80 in. (97 mm)	f^{I} (cd/m ²)	0.001-500 (0.003-1.7K)	0.003 2000 (0.01-6.8K)	0.012-8K (0.04-27.4K)	0.048-32K (0.16-109.6K)	0.192-128K (0.66-438K)
MS-2.5X	1.76 in. (45 mm)	f^{I} (cd/m ²)	0.001-500 (0.003-1.7K)	0.003 2K (0.01-6.8K)	0.012-8K (0.04-27.4K)	0.048-32K (0.16-109.6K)	0.192-128K (0.66-438K)
MS-5X	1.11 in. (28 mm)	f^{I} (cd/m ²)	0.0015-750 (0.0025-2.5K)	0.0045-3K (0.014-10.1K)	0.018-12K (0.06-41K)	0.072-48K (0.24-164K)	0.288-192K (0.96-656K)
MS-77	4.25 in. (108 mm)	f^{I} (cd/m ²)	0.0015-750 (0.0025-2.5K)	0.0045-3K (0.014-10.2K)	0.018-12K (0.06-41K)	0.072-48K (0.24-164K)	0.288-192K (0.96-656K)
FP-55 Fiber Probe	NA	f^{I} (cd/m ²)	0.0015-750 (0.0025-2.5K)	0.0045-3K (0.014-10.2K)	0.018-12K (0.06-41K)	0.072-48K (0.24-164K)	0.288-192K (0.96-656K)
CR-55 Cosine Receptor	NA	f^{c} lux	0.004-2K (0.043-21.5K)	0.012-8K (0.13-86K)	0.048-32K (0.52-344K)	0.192-128K (2.06-137.5K)	0.768-512K (3.072-550K)

Measuring Field Coverage Chart

		APERTURE SIZE IN DEGREES (BANDWIDTH IN NANOMETERS)									
ACCESS	DISTANCE	2°	(20)	1°	(10)	1/2°	(5)	1/4°	(2.5)	1/8°	(2.5)
MS-55	1.75 in. to infinity	0.076 in.		0.038 in.		0.019 in.		0.009 in.		0.005 in.	
	1000 ft.	(1.93 mm)		(0.97 mm)		(0.48 mm)		(0.24 mm)		(0.12 mm)	
	(305 meters)	420 in.		210 in.		105 in.		52.5 in.		26.3 in.	
		(10.66 meters)		(5.33 meters)		(2.67 meters)		(1.33 meters)		(0.66 meters)	
MS-1X	3.80 in.	0.076 in.		0.038 in.		0.019 in.		0.009 in.		0.005 in.	
	(97 mm)	(1.93 mm)		(0.97 mm)		(0.48 mm)		(0.24 mm)		(0.12 mm)	
MS-2.5X	1.76 in.	0.030 in.		0.015 in.		0.008 in.		0.004 in.		0.002 in.	
	(45 mm)	(0.76 mm)		(0.38 mm)		(0.19 mm)		(0.10 mm)		(0.05 mm)	
MS-5X	1.11 in.	0.016 in.		0.008 in.		0.004 in.		0.002 in.		0.001 in.	
	(28 mm)	(0.38 mm)		(0.19 mm)		(0.10 mm)		(0.05 mm)		(0.02 mm)	
MS-77	4.25 in.	0.026 in.		0.013 in.		0.006 in.		0.003 in.		0.002 in.	
	(108 mm)	(0.64 mm)		(0.32 mm)		(0.16 mm)		(0.08 mm)		(0.04 mm)	

FIGURA 16. DATOS TÉCNICOS SPECTRE SCAN [MANUAL DE OPERACIONES]